

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
  - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
  - FADED TEXT
  - ILLEGIBLE TEXT
  - SKEWED/SLANTED IMAGES
  - COLORED PHOTOS
  - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
  - GRAY SCALE DOCUMENTS
- 

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

PTO 2004-0966

S.T.I.C. Translations Branch

## Request Form for Translation

U. S. Serial No. : 09/926, 424Requester's Name: SHAOJIA A. JIANGPhone No. : 703. 308. 1008Fax No. : 703. 746. 6874Office Location: CM1, 3E-17Art Unit/Org. : 1617Group Director: John DollIs this for Board of Patent Appeals? NODate of Request: 12/3/03Date Needed By: 12/13/03

(Please do not write ASAP-indicate a specific date)

SPE Signature Required for RUSH:

## Document Identification (Select One):

\*\*(Note: Please attach a complete, legible copy of the document to be translated to this form)\*\*

1. ☒ Patent Document No. JP4-288095  
 Language Japanese  
 Country Code JP  
 Publication Date 1/24/99  
 No. of Pages 7 (filled by STIC)
2. ☐ Article Author \_\_\_\_\_  
 Language \_\_\_\_\_  
 Country \_\_\_\_\_
3. ☐ Other Type of Document \_\_\_\_\_  
 Country \_\_\_\_\_  
 Language \_\_\_\_\_

## Document Delivery (Select Preference):

☒ Delivery to Exmr. Office/Mailbox Date: 12-17-03 (STIC Only)☐ Call for Pick-up Date: \_\_\_\_\_ (STIC Only)

DEC -3 2003

Translations

(STIC)

Equivalent  
Searching

Foreign Patents

Phone: 308-0881  
 Fax: 308-0989  
 Location: Crystal Plaza 3/4  
 Room 2C01

To assist us in providing the  
 most cost effective service,  
 please answer these questions:

Will you accept an English  
 Language Equivalent?  
 \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Will you accept an English  
 abstract?  
 \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Would you like a consultation  
 with a translator to review the  
 document prior to having a  
 complete written translation?  
 \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Check here if Machine  
 Translation is not acceptable:  
 (It is the default for Japanese Patents, '93 and  
 onwards with avg. 5 day turnaround after  
 receipt)

## STIC USE ONLY

## Copy/Search

Processor: \_\_\_\_\_

Date assigned: \_\_\_\_\_

Date filled: \_\_\_\_\_

Equivalent found: \_\_\_\_\_ (Yes/No)

Doc. No.: \_\_\_\_\_

Country: \_\_\_\_\_

Remarks: \_\_\_\_\_

## Translation

Date logged in: 12-4-03PTO estimated words: 4,277Number of pages: 28In-House Translation Available: NO

In-House: \_\_\_\_\_

Translator: \_\_\_\_\_

Assigned: \_\_\_\_\_

Returned: \_\_\_\_\_

Contractor: \_\_\_\_\_

Name: SCPriority: 5Sent: 12-5-03Returned: 12-16-03

RECEIVED

2003 DEC -4 PM 12:20

TRANSLATIONS DIVISION  
USPTO SCIENTIFIC LIBRARY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-288095

(43) 公開日 平成4年(1992)10月13日

| (51) Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| C 0 7 J 63/00             |       | 7180-4C |     |        |
| A 6 1 K 31/56             | A B C | 7252-4C |     |        |
| 35/78                     | C     | 7180-4C |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平3-20308

(22) 出願日 平成3年(1991)1月22日

(71) 出願人 000003665

株式会社ツムラ

東京都中央区日本橋3丁目4番10号

(72) 発明者 林 紘司

茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツ

ムラ内

(72) 発明者 三橋 博

茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツ

ムラ内

(72) 発明者 上田 智子

茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツ

ムラ内

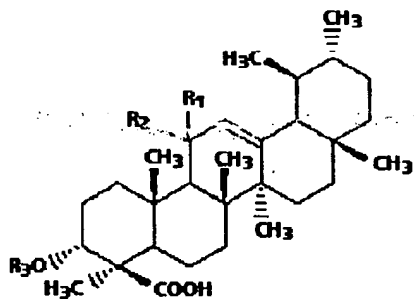
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 補体活性抑制剤

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、補体活性抑制作用を有し、自己免疫疾患等の治療に役立つ薬剤を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、下記式I



(式中、 $R_1$  および  $R_2$  は水素原子若しくは  $\alpha$ -水酸基または  $R_1$  および  $R_2$  が一緒になって酸素原子を示し、 $R_3$  は水素原子またはアセチル基を示す。) で表される化合物またはその薬理学的に許容できる塩を有効成分としてなる補体活性抑制剤である。

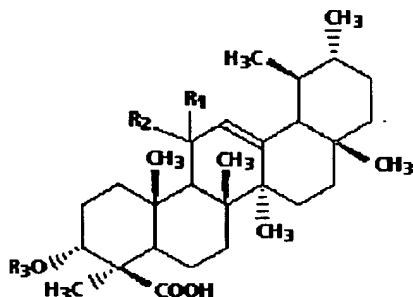
PTO 2004-0966

S.T.I.C. Translations Branch

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記式I



式I(式中、 $R_1$  および  $R_2$  は水素原子若しくは  $\alpha$ -水酸基または  $R_1$  および  $R_2$  が一緒になって酸素原子を示し、 $R_3$  は水素原子またはアセチル基を示す。)で表される化合物またはその薬理的に許容できる塩を有効成分とする補体活性抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ベーターポスエリン酸、11-ケートベーターポスエリン酸、11-アルファーヒドロキシベーターポスエリン酸等のベーターポスエリン酸誘導体を有効成分とする補体活性抑制剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】補体は生体の免疫機構の中で、外因性異物除去反応に重要な機能を有する約20種の蛋白質群であり、微妙なバランスの上でその役割を果たしており、補体が活性化されるとそれら成分がケミカルメディエーターとなり、種々の生理作用を引き起こすといわれている。このときにバランスを乱すと、種々の異常な病態、例えば全身エリトマトーデス、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患等が発現することが知られている。

【0003】また異種血液輸血による全身障害や肺炎菌による炎症のほか、最近では乾癬も補体の異常が関与しているとの説もある。

【0004】現在までのところ、上記したような疾患に対して充分満足できる有効な薬物は未だ知られていないのが現状であり、これら補体が過度に活性化することによって起こる疾患の治療に抗補体活性抑制剤が有用であると考えられる。

【0005】また、近年いくつかの生薬成分の多糖類にこのような活性が見いだされているが、多糖類は一般に混合物で、医薬品としての特定が困難であり開発は難しいものである。

【0006】

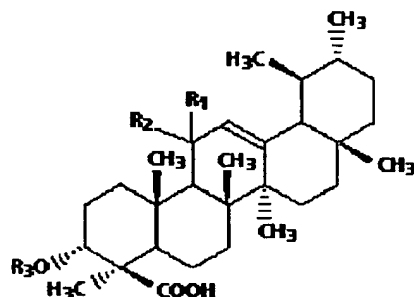
【発明が解決しようとする課題】西独のワグナーは古来薫香剤や消炎鎮痛剤として用いられてきた生薬乳香の成分であるアルファおよびベーターポスエリン酸の混合物に強い抗補体活性を見いだした[H. Wagner, *Planta Medica*, 55, 235(1989)]が、本混合物の分離は極めて困難であ

2

り、いずれの物質に真の活性があるのかが不明であった。従って、これを解決することにより、異常な補体活性化を抑制する機構によるあらたな自己免疫疾患等に対する抗炎症剤の開発が可能となることが考えられた。

【0007】本発明者等は、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、アルファおよびベーターポスエリン酸の分離に成功し、ベーターポスエリン酸にのみ活性があること、またナトリウム塩等の塩並びに11-ケートベーターポスエリン酸、11-アルファーヒドロキシベーターポスエリン酸等のポスエリン酸誘導体にも同活性が認められることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、下記式I



式I(式中、 $R_1$  および  $R_2$  は水素原子若しくは  $\alpha$ -水酸基または  $R_1$  および  $R_2$  が一緒になって酸素原子を示し、 $R_3$  は水素原子またはアセチル基を示す。)で表される化合物またはその薬理的に許容できる塩を有効成分とする補体活性抑制剤である。

【0009】以下、式Iで表される化合物を式の化合物という。

【0010】式の化合物のうち  $R_1$  および  $R_2$  が水素原子であり、 $R_3$  がアセチル基である化合物はベーターポスエリン酸であり、本発明者らによってアルファーポスエリン酸との分離がなされ、初めてその抗補体活性本体が確認され、またその他の式の化合物についても文献記載の既知物質ではあるが、抗補体活性については明らかにされておらず、本発明者らにより初めて明らかにされたものである。

【0011】式の化合物は例えば下記のようにして得ることができる。

【0012】すなわち、乳香[Boswellia carterii B. bhawdajiana, B. neglecta等の幹から抽出した樹脂]

またはインド乳香[B. serrataの樹脂]を石油エーテル、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン等の炭化水素類、メタノール、エタノール、プロパノールなどの低級アルコール類、アセトン、メチルエチルケトン、塩化メチレン、クロロホルム、酢酸エチル等の有機溶媒から選ばれる一種またはそれ以上の混合溶媒を用いて、使用する溶媒の沸点以下の温度に加熱して抽出するか、0℃から室温で超音波抽出して抽出液を得る。

【0013】この抽出液を溶媒留去し、カラムクロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィーに一回ま

たは数回付し、液を分取して画分を得る。この際、溶出溶媒として石油エーテル、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン等の炭化水素類を単独またはそれにアセトン、酢酸エチル、クロロホルム、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、アルコール類の溶媒を混合して使用することができる。

【0014】このようにして得られた画分を、さらに再結晶またはODS-シリカゲル、ポーラスポリマーゲルなどの逆相系ゲルを吸着剤とする高速液体クロマトグラフィーに付し、メタノール、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、水系の溶媒で溶出分画分取し、再結晶することにより式の化合物を得る。

【0015】また上記のようにして得られた画分のうち、酢酸等のエステル結合を有するものを含む場合は、通常用いられるアルカリ性加水分解を行うことによって、式の化合物を得ることができる。

【0016】再結晶の溶媒としては水、低級アルコール類、アセトン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、石油エーテル、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、塩化メチレン、クロロホルム等の単独またはそれ以上の混合溶媒を使用すれば良い。

【0017】次に、式の化合物の製造の具体例を示す。

【0018】具体例1乳香の石油エーテルエキス117gを1Kgのシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン/アセトン系の溶媒で溶出し、5番目のフラクションをさらにODS系の逆相ゲル(Fuji-Gel Q-3)でメタノール/水溶媒で溶出精製することにより、アルファーおよびベーターボスエリン酸のアセテートほぼ1:1の混合物が得られた。これをヘキサン/アセトン混合溶媒から結晶化させ873mgの無色の結晶状物質を得た。この混合物を調製用HPLCカラム[D-ODS-10(YMC, 溶媒系:THF:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=3:12:1, 流量:3ml/min)]を用いて分離を行った。R<sub>t</sub>約11.5分で溶出する画分および約125分前後で溶出する画分の溶媒を留去することにより、下記の理化学的性質を有するアルファーボスエリン酸アセテート220mgならびに式I中R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が水素原子、R<sub>3</sub>がアセチル基であるベーターボスエリン酸アセテート280mgを得た。

【0019】アルファーボスエリン酸アセテート(メタノールより再結晶、無色針状晶)

融点:218~219℃

$[\alpha]_D^{25} +66.1^\circ$  (c=0.3, CHCl<sub>3</sub>)

マスマスペクトル

EI-MS m/z:498[M]<sup>+</sup>, 218, 203

赤外線吸収スペクトル IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

2972, 2944, 2860, 1744,

1730, 1705, 1242

プロトン核磁気共鳴スペクトル( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.84, 0.87, 0.87, 0.90,

1.01, 1.19, 1.12(each 3H, s),

2.09(3H, s), 5.20(1H, t, J=3.4Hz),

5.30(1H, t, J=2.5)

【0020】ベーターボスエリン酸アセテート(メタノールから再結晶、無色針状晶)

融点:227~228℃

$[\alpha]_D^{25} +62.3^\circ$  (c=0.3, CHCl<sub>3</sub>)

マスマスペクトル

EI-MS m/z:498[M]<sup>+</sup>, 218, 203

赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

2976, 2920, 2860, 1746,

10 1730, 1702, 1240

プロトン核磁気共鳴吸収スペクトル( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.80(3H, d, J=6.3Hz), 0.81(3H, s),

0.91(3H, s), 0.93(3H, d, J=6.1Hz),

1.05, 1.12, 1.25(each 3H, s),

2.10(3H, s), 5.15(1H, t, J=3.5Hz),

5.31(1H, t, J=2.5Hz)

【0021】具体例2

具体例1で得たベーターボスエリン酸アセテート400mgを5%水酸化カリウム/メタノール25mlに溶かし水浴上8時間還流後、2N塩酸25mlを反応液に加え、エーテルにて3回抽出した。エーテル層を合わせ飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し溶媒を留去した。残渣を調製用HPLC(D-ODS-10カラム、THF-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O=3:12:1)で精製し、ヘキサン-アセトンから再結晶することにより、下記の理化学的性質を有し、式I中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>が水素原子であるベーターボスエリン酸を白色の結晶状物質として288mg得た。

【0022】融点:236~238℃

30  $[\alpha]_D^{25} +100.7^\circ$  (c=0.3, CHCl<sub>3</sub>)

マスマスペクトル

EI-MS m/z:456[M]<sup>+</sup>, 441, 238,

218, 203

赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3440, 2944, 1696

プロトン核磁気共鳴スペクトル( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.79(3H, d, J=5.9Hz),

0.81, 0.90, (each 3H, s),

0.92(3H, d, J=6.1Hz),

40 1.04, 1.09, 1.35(each 3H, s),

4.08(1H, t, J=2.7Hz),

5.14(1H, t, J=3.6Hz)

【0023】具体例3

具体例2で得たベーターボスエリン酸を15mgとり0.05M水酸化ナトリウム/メタノール3mlによく振って溶かし、減圧下乾固しない程度に濃縮後、エーテルを加えることにより、下記の理化学的性質を有する白色粉末状のベーターボスエリン酸ナトリウム塩を得た。

【0024】融点: >290℃  $[\alpha]_D^{25} +51.4^\circ$  (c=0.2, MeOH)

50 赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3432, 1634, 1552, 1348, 880

## 【0025】具体例4

インド乳香100gを粉砕し室温下石油エーテル2lで2回抽出し、さらにクロロホルム2lで2回抽出し、各々を減圧下濃縮して溶媒を留去し、各々から24.0g及び27.5gのエキスを得た。クロロホルムエキス10gを300gのシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサンから2~30%アセトンで順次混合し、最後はアセトンのみで溶出して13フラクションに分画した。このうちフラクション6番目と7番目を合わせた1.89gを57gのシリカゲルのカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン/酢酸エチル=4:1で溶出した。この5番目の画分を更にヘキサン/アセトン5:1の混合溶媒でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製を繰り返し、紫外線を吸収する物質を得、ヘキサン/アセトンから再結晶し、下記に示した理化学的性質を有し、式I中R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が一緒になって酸素原子、R<sub>3</sub>がアセチル基である11-ケト-ペクターボスエリン酸-3-O-アセテート23.1mgの無色プリズム晶を得た。

【0026】融点:270~276℃

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +77.5° (c=0.44, CHCl<sub>3</sub>)

マスペクトル

EI-MS m/z:

512(M<sup>+</sup>), 273(base peak), 232

高分解能EI-MS m/z:

計算値 512.3501 C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>

実測値 512.3506

紫外線吸収スペクトル UV<sub>max</sub> nm(ε):252(11200)赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3300~2500, 1730, 1695,

1650, 1615, 1250

プロトン核磁気共鳴スペクトル(δ ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.80(3H, d, J=6.2Hz), 0.83(3H, s),

0.95(3H, br. s),

1.15, 1.20, 1.24, 1.35(each 3H, s),

2.10(3H, s), 2.41(1H, s),

5.31(1H, br. s), 5.56(1H, s)

## 【0027】具体例5

具体例4で得た11-ケト-ペクターボスエリン酸-3-O-アセテート50mgを25mlの5%水酸化カリウム/メタノール溶液に溶かし、水浴上5.5時間加熱還流し放冷後、反応液を100mlの水で希釈し塩酸性にして析出した白色沈殿をエーテル100mlずつで3回抽出した。抽出液を合わせ、飽和食塩水で2回洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去し、下記に示した理化学的性質を有し、式I中R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が一緒になって酸素原子、R<sub>3</sub>が水素原子である11-ケト-ペクターボスエリン酸511mgの無色針状晶を得た。

【0028】融点:192~193℃

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +131° (c=1.0, CHCl<sub>3</sub>)

マスペクトル

EI-MS m/z:470(M<sup>+</sup>), 455, 273, 232

高分解能EI-MS m/z:

計算値 470.3391 C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>

実測値 470.3400

紫外線吸収スペクトル UV<sub>max</sub> nm(ε):250(11400)赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3500~2400, 1695, 1650, 1615

プロトン核磁気共鳴スペクトル(δ ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.79(3H, d, J=6.2Hz),

10 0.82(3H, d, J=5.6),

0.95, 1.13, 1.19,

1.31, 1.35(each 3H, s),

2.43(1H, s), 4.08(1H, br. s.),

5.55(1H, s)

## 【0029】具体例6

具体例4で得た化合物を得たフラクションに続く8番目のフラクションはほぼ単一の化合物を含みヘキサン/アセトンより再結晶し無色の針状晶176.4mgを得た。また、母液349mgを10.5gのシリカゲルで再カラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン/酢酸エチル4:1~2:1で溶出し、6フラクションに分画し、その2番目と3番目のフラクションよりヘキサン/アセトンから再結晶することにより、同一の物質を無色針状晶として69mgを得た。これらは下記に示した理化学的性質を有し、式I中R<sub>1</sub>が水素原子、R<sub>2</sub>がα-水酸基、R<sub>3</sub>がアセチル基である11-アルファ-ヒドロキシ-ペクターボスエリン酸-3-O-アセテートを得た。

【0030】融点:160~166℃

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +11.3° (c=0.21, CHCl<sub>3</sub>)

30 マスペクトル

EI-MS m/z:514(M<sup>+</sup>), 496, 234(base peak)

高分解能EI-MS m/z:

計算値514.3658 C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>

実測値514.3680

赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3640, 3300~2500, 1750, 1730, 1280

プロトン核磁気共鳴スペクトル(δ ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.86(3H, d, J=6Hz),

0.88, 0.92, 1.07, 1.11,

1.22, 1.25(each 3H, s),

1.63(1H, d, J=8.8Hz),

2.10(3H, s),

4.27(1H, dd, J=9.2, 3.3Hz),

5.18(1H, d, J=2.9Hz),

5.30(1H, br. s)

## 【0031】具体例7

具体例6で得た11-アルファ-ヒドロキシ-ペクターボスエリン酸-3-O-アセテートを50.3mgとり、5%水酸化カリウム/メタノール6mlに溶かして水浴上6時間加熱還流し、放冷後メタノールを減圧下留去した。残渣をエー

テル20mlに溶かし、2規定塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水各15mlずつで洗った後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、ヘキサン/エタノールから再結晶し、下記に示した理化学的性質を有し、式I中R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が水素原子、R<sub>2</sub>が $\alpha$ -水酸基である11-アルファードロキシペーターボスエリン酸の無色結晶26.3mgを得た。

【0032】融点:171-178°C

$[\alpha]_D^{25} = +63.9^\circ$  (c=0.33, CHCl<sub>3</sub>)

マススペクトル

EI-MS m/z: 472(M<sup>+</sup>), 454(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 234(base peak)

高分解能EI-MS m/z:

計算値 472.3552 C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>

実測値 472.3556

赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3690, 3000~2500, 1720

プロトン核磁気共鳴スペクトル( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.81(3H, s), 0.85(3H, d, J=5.5Hz),

0.93(3H, br. s),

1.07, 1.10, 1.18, 1.37(each 3H, s),

1.61(1H, d, J=8.8Hz),

4.08(1H, br. s),

4.26(1H, dd, J=9.2, 3.3Hz),

5.18(1H, d, J=2.9Hz)

【0033】参考例

具体例1で得たアルファードロキシペーターボスエリン酸アセテート420mgに5%水酸化カリウム/メタノールを25ml加え、水浴上8時間還流後、反応液に2N塩酸25mlを加え、析出した白色沈殿をエーテルにて抽出した。エーテル層を飽和食塩水で洗

ることにより、下記の理化学的性質を有するアルファードロキシペーターボスエリン酸を無色鱗片状品として312mg得た。

【0034】融点:140/190-230°C(二重融点)

$[\alpha]_D^{25} = +108.7^\circ$  (c=0.3, CHCl<sub>3</sub>)

EI-MS m/z:

456(M<sup>+</sup>), 441, 259, 238, 218, 203

赤外線吸収スペクトル: IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3400, 2944, 2856, 1720

プロトン核磁気共鳴スペクトル( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

10 0.84, 0.87, 0.87, 0.89,

1.00, 1.15, 1.35, (each 3H, s),

4.08(1H, t, J=2.6Hz),

5.20(1H, t, J=3.4Hz)

【0035】次に式の化合物が優れた抗補体活性を有し、補体活性抑制剤として有用であることについて、実験例を挙げて説明する。

【0036】実験例1

抗補体活性の測定はメイヤーの方法を1/5のスケールにして行った(Mayer, M.M. Experimental Immunochimistry, 2nd. P. 133)。すなわち、抗体としてウサギ抗ヒツジ赤血球を用い、抗原としてヒツジ赤血球を、補体源としてヒトCPD-保存血漿を用いた。式の化合物は水に難溶性のため、ジメチルスルフォキシド(DMSO)に10mMとなるように溶解させ、最終濃度50 $\mu$ Mになるようにグラーチン-ベルナル緩衝液に添加した。希釈血漿を0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.7mlに変えて、感作ヒツジ赤血球、蒸留水と混合し37°Cで2時間しんとう後、氷冷して反応を止め、2,500rpmで5分間遠心し、上清の414nmにおける吸光度を各希釈血漿濃度において測定した。また、DMSO1 $\mu$ lをコントロールとして用いた。その結果について以下に示す。なお表中、CBは機械的溶血を示す。

【0037】第1表(具体例で得た化合物の抗補体活性)

| 希釈血漿用量<br>(ml) | コントロール | 具体例2で得た化合物 | 具体例3で得た化合物 | 具体例5で得た化合物 | 具体例7で得た化合物 | 参考例で得た化合物 |
|----------------|--------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| 0.25           | 0.039  | 0.012      | 0.007      | 0.012      | 0.024      | 0.077     |
| 0.30           | 0.085  | 0.030      | 0.015      | 0.048      | 0.045      | 0.093     |
| 0.35           | 0.128  | 0.049      | 0.023      | 0.054      | 0.080      | 0.131     |
| 0.40           | 0.191  | 0.081      | 0.033      | 0.079      | 0.098      | 0.168     |
| 0.50           | 0.290  | 0.089      | 0.031      | 0.154      | 0.105      | 0.243     |
| 0.70           | 0.532  | 0.272      | 0.185      | 0.394      | 0.447      | 0.463     |
| CB             | 0.008  | 0.014      | 0.005      | 0.010      | 0.003      | 0.033     |

【0038】第2表(具体例2で得た化合物の濃度依存性)

| 希釈血漿<br>用量(ml) | コント<br>ロール | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|----------------|------------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.23           | 0.009      | 0.020      | 0.013      | 0.006        | 0.011     |
| 0.30           | 0.009      | 0.008      | 0.018      | 0.045        | 0.051     |
| 0.35           | 0.067      | 0.014      | 0.054      | 0.082        | 0.107     |
| 0.40           | 0.207      | 0.121      | 0.147      | 0.175        | 0.231     |
| 0.50           | 0.293      | 0.173      | 0.237      | 0.307        | 0.354     |
| 0.70           | 0.471      | 0.381      | 0.418      | 0.455        | 0.417     |
| CB             | 0.009      | 0.020      | 0.013      | 0.006        | 0.011     |

【0039】第3表(具体例3で得た化合物の濃度依存性)

| 希釈血漿<br>用量(ml) | コント<br>ロール | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|----------------|------------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.25           | 0.052      | 0.007      | 0.021      | 0.039        | 0.033     |
| 0.30           | 0.009      | 0.015      | 0.036      | 0.062        | 0.060     |
| 0.35           | 0.135      | 0.023      | 0.063      | 0.091        | 0.105     |
| 0.40           | 0.191      | 0.033      | 0.092      | 0.121        | 0.179     |
| 0.50           | 0.309      | 0.031      | 0.163      | 0.215        | 0.256     |
| 0.70           | 0.527      | 0.185      | 0.361      | 0.445        | 0.483     |
| CB             | 0.004      | 0.005      | 0.008      | 0.005        | 0.011     |

【0040】第4表(具体例5で得た化合物の濃度依存性)

| 希釈血漿<br>用量(ml) | コント<br>ロール | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|----------------|------------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.25           | 0.090      | 0.074      | 0.022      | 0.015        | 0.016     |
| 0.30           | 0.139      | 0.100      | 0.136      | 0.097        | 0.087     |
| 0.35           | 0.235      | 0.168      | 0.192      | 0.152        | 0.185     |
| 0.40           | 0.283      | 0.231      | 0.241      | 0.228        | 0.251     |
| 0.50           | 0.411      | 0.337      | 0.362      | 0.343        | 0.382     |
| 0.70           | 0.472      | 0.470      | 0.461      | 0.467        | 0.469     |
| CB             | 0.012      | 0.017      | 0.022      | 0.015        | 0.016     |

【0041】これらの結果から明らかなように、式の化合物は抗補体活性を有することが証明された。

【0042】次に、式の化合物の投与量および製剤化について説明する。

【0043】式の化合物はそのまま、あるいは慣用の製剤担体と共に動物および人に投与することができる。投与形態としては、特に限定がなく、必要に応じ適宜選択して使用され、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

【0044】経口剤として所期の効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で式の化合物の重量として10~3gを1日数回に分けての服用が適当と思われる。

【0045】経口剤は、例えばデンプン、乳糖、白糖、

マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。

【0046】この種の製剤には、適宜前記賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができる。それぞれの具体例は以下に示すごとくである。

【0047】[結合剤]デンプン、デキストリン、アラビアゴム末、ゼラチン、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール。

【0048】[崩壊剤]デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース。

【0049】[界面活性剤]ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ポリソルベート80。

【0050】[滑沢剤]タルク、ロウ類、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ポリエチレングリコール。

【0051】[流動性促進剤]軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム。

【0052】また、式の化合物は、懸濁液、エマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤としても投与することができ、これらの各種剤形には、矯味矯臭剤、着色剤を含有してもよい。

【0053】非経口剤として所期の効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で式の化合物の重量として1日5~500mgまでの静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射が適当と思われる。

【0054】この非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤を加えてもよい。また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥技術により水分を除去し、使用直前に凍結乾燥物から液剤を再調製することもできる。さらに、必要に応じて適宜、等張化剤、安定剤、防腐剤、無痛化剤等を加えても良い。

【0055】その他の非経口剤としては、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、常法に従って製造される。

【0056】次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に



## 11

説明するが、本発明はこれによりなら制限されるものではない。

## 【0057】実施例1

|                         |      |
|-------------------------|------|
| ①コーンスターチ                | 44g  |
| ②結晶セルロース                | 40g  |
| ③カルボキシメチル<br>セルロースカルシウム | 5g   |
| ④軽質無水ケイ酸                | 0.5g |
| ⑤ステアリン酸マグネシウム           | 0.5g |
| ⑥具体例2で得た化合物             | 10g  |
| 計                       | 100g |

上記の処方に従って①～⑥を均一に混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。この錠剤一錠には、具体例2で得た化合物20mgが含有されており、成人1日5～15錠を数回にわけて服用する。

## 【0058】実施例2

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| ①結晶セルロース                | 84.5g |
| ②ステアリン酸マグネシウム           | 0.5g  |
| ③カルボキシメチル<br>セルロースカルシウム | 5g    |
| ④具体例3で得た化合物             | 10g   |
| 計                       | 100g  |

上記の処方に従って①、④および②の一部を均一に混合し、圧縮成型した後、粉碎し、③および②の残量を加えて混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。この錠剤一錠には、具体例3で得た化合物20mgが含有されており、成人1日5～15錠を数回にわけて服用する。

## 【0059】実施例3

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| ①結晶セルロース                      | 49.5g |
| ②10%ヒドロキシプロピル<br>セルロースエタノール溶液 | 35g   |
| ③カルボキシメチル<br>セルロースカルシウム       | 5g    |
| ④ステアリン酸マグネシウム                 | 0.5g  |
| ⑤具体例5で得た化合物                   | 10g   |
| 計                             | 100g  |

上記の処方に従って①、②および⑤を均一に混合し、常法によりねつ和し、押し出し造粒機により造粒し、乾燥・解砕した後、③および④を混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。この錠剤一錠には、具体例5で得た化合物20mgが含有されており、成人1日5～15錠を数回にわけて服用する。

## 【0060】実施例4

## 12

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| ①コーンスターチ                | 34.5g |
| ②ステアリン酸マグネシウム           | 50g   |
| ③カルボキシメチル<br>セルロースカルシウム | 5g    |
| ④軽質無水ケイ酸                | 0.5g  |
| ⑤具体例7で得た化合物             | 10g   |
| 計                       | 100g  |

上記の処方に従って①～⑤を均一に混合し、圧縮成型機にて圧縮成型後、破砕機により粉碎し、篩別して顆粒剤を得た。この顆粒剤1gには、具体例7で得た化合物100mgが含有されており、成人1日1～3gを数回にわけて服用する。

## 【0061】実施例5

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| ①結晶セルロース                      | 55g  |
| ②10%ヒドロキシプロピル<br>セルロースエタノール溶液 | 35g  |
| ③具体例2で得た化合物                   | 10g  |
| 計                             | 100g |

上記の処方に従って①～③を均一に混合し、ねつ和した。押し出し造粒機により造粒後、乾燥し、篩別して顆粒剤を得た。この顆粒剤1gには、具体例2で得た化合物100mgが含有されており、成人1日1～3gを数回にわけて服用する。

## 【0062】実施例6

|             |       |
|-------------|-------|
| ①コーンスターチ    | 89.5g |
| ②軽質無水ケイ酸    | 0.5g  |
| ③具体例3で得た化合物 | 10g   |
| 計           | 100g  |

上記の処方に従って①～③を均一に混合し、200mgを2号カプセルに充填した。このカプセル剤1カプセルには、具体例3で得た化合物20mgが含有されており、成人1日5～15カプセルを数回にわけて服用する。

## 【0063】実施例7

|             |       |
|-------------|-------|
| ①大豆油        | 5g    |
| ②注射用蒸留水     | 89.5g |
| ③大豆リン脂質     | 2.5g  |
| ④グリセリン      | 2g    |
| ⑤具体例5で得た化合物 | 1g    |
| 計           | 100g  |

上記の処方に従って⑤を①および③に溶解し、これに②と④の溶液を加えて乳化し、注射剤を得た。

フロントページの続き

(72)発明者 長沢滋治

北海道札幌市東区北28条東3丁目 北光住  
宅504-31

PTO 04-0966

Japan Kokai

Document No. 04-288095

**COMPLEMENT ACTIVITY INHIBITOR**

(Hotai Kassei Yokuseizai)

Koji HAYASHI, Hiroshi MIHASHI

Tomoko UEDA and Shigeharu NAGASAWA

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D. C.

December 2003

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

|                               |   |  |
|-------------------------------|---|--|
| <u>Country</u>                | : | Japan  |
| <u>Document No.</u>           | : | 04-288095  |
| <u>Document Type</u>          | : | Kokai  |
| <u>Language</u>               | : | Japanese   |
| <u>Inventor(s)</u>            | : | Koji HAYASHI<br>Hiroshi MIHASHI<br>Tomoko UEDA<br>Shigeharu NAGASAWA |
| <u>Applicant</u>              | : | Tsumura & Co.  |
| <u>IPC</u>                    | : | C 07 J 63/00<br>A 61 K 31/56<br>35/78                                |
| <u>Date of Filing</u>         | : | January 22, 1991   |
| <u>Publication Date</u>       | : | October 13, 1992   |
| <u>Foreign Language Title</u> | : | Hotai Kassei Yokuseizai  |
| <u>English Title</u>          | : | COMPLEMENT ACTIVITY<br>INHIBITOR                                     |

## SPECIFICATION

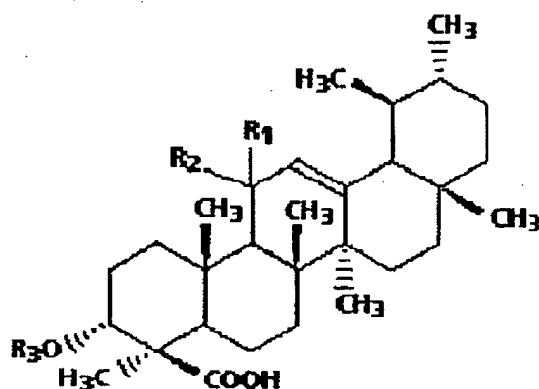
(54) Title of the Invention

Complement Activity Inhibitor

/2

[Claims]

[Claim 1] A complement activity inhibitor which takes a compound expressed by the following formula I



(where  $R_1$  and  $R_2$  represent hydrogen atoms or  $\alpha$ -hydroxyl group or both  $R_1$  and  $R_2$  represent an oxygen atom, and  $R_3$  represents a hydrogen atom or an acetyl group in Formula I.) or a pharmacologically allowable salt thereof as active ingredient.

[Detailed Description of the Invention]

<sup>1</sup> Numbers in margin indicate pagination in foreign text.

[0001]

[Field of Industrial Application] The present invention relates a complement activity inhibitor with  $\beta$ -boswellic acid and  $\beta$ -boswellic acid derivatives such as 11-keto- $\beta$ -boswellic acid, 11- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -boswellic acid, etc. as active ingredient.

[0002]

[Prior Art] In the immune mechanism of living bodies, complements are a group of about 20 proteins having an important function in reactions for removing extrinsic foreign bodies and playing their roles in a subtle balance. If the complements are activated, their constituents are said to become chemical mediators and cause various physiological actions. It has been known that if the balance is disordered at this time, various abnormal pathoses, for example, autoimmunity diseases such as general erythematodes, chronic rheumatoid arthritis, etc. manifest.

[0003] Besides general disturbance caused by heterologous blood transfusion or inflammations caused by pneumococcus, more recently, there is such an opinion that psoriasis also relates to the abnormality of complements.

[0004] It is the present situation that efficient drugs which are fully satisfactory for the diseases as described above

have not been known so far. Anti-complement activity inhibitors are considered useful in the therapy of these diseases caused by excessive activation of the complements.

[0005] Recently, such an activity has been found in polysaccharides of some constituents of crude drugs, but the polysaccharides are generally mixtures and are hard to be specified as medicines, thus the development is difficult.

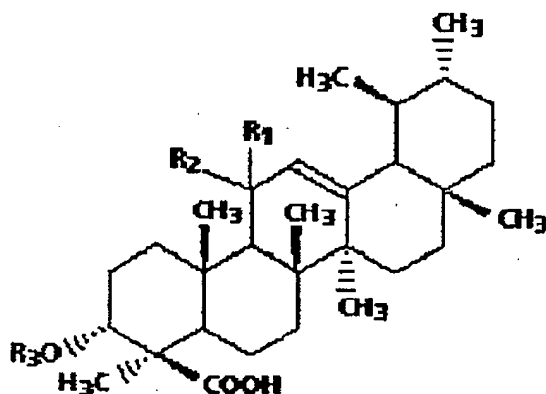
[0006]

[Problem to Be Solved by the Invention] Wagner of West Germany discovered a strong anti-complement activity in a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -boswellic acids being constituents of a crude drug - mastic which has been used as fumet and antiphlogistic/analgetic from the old [H. Wagner, *Planta Medica*, **55**, 235 (1989)], but the separation of this mixture was extremely difficult, and which substance has true activity was unclear. Accordingly, it was considered to enable the development of new anti-inflammatory agents against autoimmunity diseases based on the mechanism of inhibiting abnormal activation of complements by solving the problem.

[0007] The inventors repeated earnest studies which should solve the above problem, consequently they were successful in the separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -boswellic acids and discovered that only  $\beta$ -boswellic acid had the activity and the same activity was

also found in its salts such as sodium salt, etc. and boswellic acid derivatives such as 11-keto- $\beta$ -boswellic acid, 11- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -boswellic acid, etc., thus came to accomplish the present invention.

[0008] Namely, the present invention is a complement activity inhibitor which takes a compound expressed by the following formula I



(where  $R_1$  and  $R_2$  represent hydrogen atoms or  $\alpha$ -hydroxyl group or both  $R_1$  and  $R_2$  represent an oxygen atom, and  $R_3$  represents a hydrogen atom or an acetyl group in Formula I.) or a pharmacologically allowable salt thereof as active ingredient.

[0009] The compounds expressed by the Formula I called compounds of the formula below.

[0010] In the compounds of the formula, a compound in which  $R_1$  and  $R_2$  are hydrogen atoms and  $R_3$  is an acetyl is  $\beta$ -boswellic acid, the authors carried out its separation from  $\alpha$ -boswellic



acid and first confirmed that it is the main body of anti-complement activity, and other compounds of the formula are also known substances given in the literature, but their anti-complement activity is not clarified, and the activity is first clarified by the authors.

[0011] For example, the compounds of the formula can be obtained as follows.

[0012] Namely, mastic (a resin exudated from the trunk of *Boswellia carteri*, *Boswellia bhaw-dajiana*, *Boswellia neglecta*, etc.) or Indian mastic (*Boswellia serrata*) is extracted by heating it to a temperature below the boiling point of employed solvent with a solvent or a mixed solvent of two or more selected from organic solvents, e. g., hydrocarbons such as petroleum ether, pentane, hexane, cyclohexane, etc., lower alcohols such as methanol, ethanol, propanol, etc., acetone, methyl ethyl ketone, methylene chloride, chloroform, ethyl acetate, etc. or extracted by ultrasonic wave from 0°C to room temperature to obtain an extract.

[0013] This extract was fractionated to give fractions by removing the solvents and applying it to column chromatography or

/3

high-speed liquid chromatography once or several times. At this time, solvents, e. g., hydrocarbons such as petroleum ether,

pentane, hexane, cyclohexane, etc. can be used separately or by mixing with solvents such as acetone, ethyl acetate, chloroform, methylene chloride, tetrahydrofuran, alcohols, etc. as eluting solvents.

[0014] The compounds of the formula are obtained by further recrystallizing the fractions thus obtained or by applying them to high-speed liquid chromatography with a reversed-phase gel such as ODS silica gel, porous polymer gel, etc. as adsorbent, to elute/fractionate fractions with methanol, tetrahydrofuran, acetonitrile, aqueous solvent and then recrystallization.

[0015] When a compound having an ester bond such as acetic acid, etc. is contained in the fractions obtained as described above, the compounds of the formula can be obtained by commonly-used alkaline hydrolysis.

[0016] As solvents for the recrystallization, water, lower alcohols, acetone, ethyl acetate, tetrahydrofuran, petroleum ether, pentane, hexane, cyclohexane, methylene chloride, chloroform, etc. may be used separately or by mixing two or more of them.

[0017] Next, specific examples of preparing the compounds of the formula are shown.

[0018] [Specific Example 1]

A nearly 1:1 mixture of acetates of  $\alpha$ -boswellic acid and  $\beta$ -boswellic acid was obtained by applying 117 g of a petroleum ether extract of mastic to 1 kg of a silica gel column chromatography, eluting with a hexane/acetone solvent and then further purifying the 5th fraction by elution with an ODS reversed-phase gel (Fuji-Gel Q-3) and a methanol/water solvent. The mixture was crystallized from a hexane/acetone mixed solvent to obtain 873 mg of a colorless crystalline substance. This mixture was separated by a preparative HPLC column [D-ODS-10 (YMC, solvent; THF : CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 3:12:1, flow rate; 3 mL/min)]. 220 mg of  $\alpha$ -boswellic acid acetate and 280 mg of  $\beta$ -boswellic acid acetate ( $R_1$  and  $R_2$  are hydrogen atoms and  $R_3$  is an acetyl in Formula I) having the following physicochemical properties were obtained by removing the solvents of a fraction eluted at  $R_t$  of about 115 min and a fraction eluted at  $R_t$  of about 125 min.

[0019]  $\alpha$ -Boswellic acid acetate (recrystallized from methanol, colorless needle crystal)

m.p. 218 - 219°C

$[\alpha]_D = +66.1^\circ$  ( $c = 0.3$ , CHCl<sub>3</sub>)

mass spectrum

EI-MS  $m/z$ : 498 [ $M^+$ ], 218, 203

IR absorption spectrum  $IR_{max}$  cm<sup>-1</sup>:

2972, 2944, 2860, 1744,

1730, 1705, 1242

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.84, 0.87, 0.87, 0.90

1.01, 1.19, 1.12 (each 3H, s)

2.09 (3H, s), 5.20 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz),

5.30 (1H, t,  $J = 2.5$  Hz)

[0020]  $\beta$ -Boswellic acid acetate (recrystallized from methanol,  
colorless needle crystal)

m.p. 227 - 228°C

$[\alpha]_D = +62.3^\circ$  ( $c = 0.3$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

mass spectrum

EI-MS  $m/z$ : 498  $[M^+]$ , 218, 203

IR absorption spectrum  $\text{IR}_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :

2976, 2920, 2860, 1746,

1730, 1702, 1240

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.80 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz), 0.81 (3H, s)

0.91 (3H, s), 0.93 (3H, t,  $J = 6.1$  Hz),

1.05, 1.12, 1.25 (each 3H, s)

2.10 (3H, s), 5.15 (1H, t,  $J = 3.5$  Hz)

5.31 (1H, t,  $J = 2.5$  Hz)

[0021] [Specific Example 2]

400 mg of  $\beta$ -boswellic acid acetate obtained in Specific Example 1 was dissolved in 25 mL of a 5% potassium hydroxide/methanol and refluxed for 8 hr on a water bath, then 25 mL of 2 N hydrochloric acid was added to the reaction solution, and then the mixture was extracted three times with ether. The ether layers were put together and washed with a saturated aqueous table salt solution, then dried over anhydrous magnesium sulfate and the solvent was removed. 288 mg of  $\beta$ -boswellic acid ( $R_1$ ,  $R_2$  and  $R_3$  are hydrogen atoms) having the following physicochemical properties was obtained as a white crystalline substance by purifying the residue with a preparative HPLC (D-ODS-10 column, THF :  $\text{CH}_3\text{CN}$  :  $\text{H}_2\text{O}$  = 3:12:1) and then recrystallizing it from hexane-acetone.

[0022] m.p. 236 - 238°C

$[\alpha]_D = +100.7^\circ$  ( $c = 0.3$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

mass spectrum

EI-MS  $m/z$ : 456 [ $M^+$ ], 441, 238

218, 203

IR absorption spectrum  $\text{IR}_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :

3440, 2944, 1696

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.79 (3H, d,  $J = 5.9$  Hz),

0.81, 0.90 (each 3H, s)

0.92 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz),  
1.04, 1.09, 1.35 (each 3H, s)  
4.08 (1H, t,  $J = 2.7$  Hz)  
5.14 (1H, t,  $J = 3.6$  Hz)

[0023] [Specific Example 3]

A white powder sodium  $\beta$ -boswellate having the following physicochemical properties was obtained by taking 15 mg of the  $\beta$ -boswellic acid obtained in Specific Example 2, well shaking and dissolving it in 3 mL of 0.05 M sodium hydroxide/methanol, concentrating it under reduced pressure to an extent of no dry-out and then adding ether thereto.

[0024] m.p.  $> 290^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_D = +51.4^{\circ}$  ( $c = 0.2$ , MeOH)

IR absorption spectrum  $\text{IR}_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ :

/4

3432, 1634, 1552, 1348, 880

[0025] [Specific Example 4]

24.0 g and 27.5 g of extracts were obtained by crushing 100 g of Indian mastic, extracting it twice with 2 L of petroleum ether, further extracting it with 2 L of chloroform at room temperature, and then concentrating the extracts under reduced pressure to remove the solvents, respectively. 10 g of the chloroform extract of mastic was applied to 300 g of a silica gel

column chromatography, premixed with hexane and 2 - 30% of acetone in order and finally eluted with acetone only to fractionate the extract into 13 fractions. 1.89 g of a mixture of the 6th and 7th fractions was applied to 57 g of a silica gel column chromatography and then eluted with hexane/ethyl acetate = 4:1. 23.1 mg of a colorless prism crystal 11-keto- $\beta$ -boswellic acid-3-O-acetate (both R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> become an oxygen atom and R<sub>3</sub> is an acetyl in Formula I) having the following physicochemical properties shown below was obtained by further repeatedly purifying this 5th fraction with a mixed solvent of hexane/ethyl acetate = 5:1 to obtain a substance absorbing UV ray and then recrystallizing it from hexane/acetone.

[0026] m.p. 270 - 276°C

$[\alpha]_D = +77.5^\circ$  (c = 0.44, CHCl<sub>3</sub>)

mass spectrum

EI-MS m/z:

512 [M<sup>+</sup>], 273 (base peak), 232

high-resolution EI-MS m/z:

calcd. 512.3501 C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub>

found 512.3506

UV absorption spectrum UV<sub>max</sub> nm( $\epsilon$ ): 252 (11200)

IR absorption spectrum IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3300 - 2500, 1730, 1695

1650, 1615, 1250

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.80 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz), 0.83 (3H, s)

0.95 (3H, br.s)

1.15, 1.20, 1.24, 1.35 (each 3H, s)

2.10 (3H, s), 2.41 (1H, s)

5.31 (1H, br.s), 5.56 (1H, s)

[0027] [Specific Example 5]

500 mg of 11-keto- $\beta$ -boswellic acid 3-O-acetate obtained in Specific Example 4 was dissolved in 25 mL of a 5% potassium hydroxide/methanol and thermally refluxed for 5.5 hr on a water bath and cooled, then the reaction solution was diluted with 100 mL of water, acidified with hydrochloric acid and a separated white precipitate was extracted three times with 100 mL of ether each. 511 mg of a colorless needle crystal 11-keto- $\beta$ -boswellic acid (both  $R_1$  and  $R_2$  become an oxygen atom and  $R_3$  is a hydrogen atom in Formula I) having the physicochemical properties shown below was obtained by putting the extracts together, washed it twice with saturated table salt solution, drying it over anhydrous magnesium sulfate and then removing the solvent.

[0028] m.p. 192 - 193°C

$[\alpha]_D = +131^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

mass spectrum



EI-MS m/z: 470 [M<sup>+</sup>], 455, 273, 232

high-resolution EI-MS m/z:

calcd. 470.3391 C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>

found 470.3400

UV absorption spectrum UV<sub>max</sub> nm(ε): 250 (11400)

IR absorption spectrum IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3500 - 2400, 1695, 1650, 1615

proton NMR spectrum (δ ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.79 (3H, d, J = 6.2 Hz)

0.82 (3H, d, J = 5.6 Hz)

0.95, 1.13, 1.19

1.31, 1.35 (each 3H, s)

2.43 (1H, s), 4.08 (1H, br.s)

5.55 (1H, s)

[0029] [Specific Example 6]

The 8th fraction successive to the fraction giving the compound obtained by Specific Example 4 contained a nearly single compound and was recrystallized from hexane/acetone to obtain 176.4 mg of a colorless needle crystal. 69 mg of the same substance was obtained as a colorless needle crystal by applying 349 mg of a mother liquor to 10.5 g of a silica column chromatography again, eluting it with 4:1 - 2:1 hexane/ethyl acetate, fractionating into 6 fractions and then recrystallizing

the 2nd and 3rd fractions from hexane/acetone. They gave 11- $\alpha$ -hydroxy-boswellic acid-3-O-acetate (both R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> become an oxygen atom and R<sub>3</sub> is an acetyl in Formula I) having the physicochemical properties shown below.

[0030] m.p. 160 - 166°C

$[\alpha]_D = +11.3^\circ$  (c = 0.21, CHCl<sub>3</sub>)

mass spectrum

EI-MS m/z: 514 [M<sup>+</sup>], 496, 234 (base peak)

high-resolution EI-MS m/z:

calcd. 514.3658 C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>

found 514.3680

IR absorption spectrum IR<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>:

3640, 3300 - 2500, 1750, 1730, 1280

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in CDCl<sub>3</sub>):

0.86 (3H, d, J = 6 Hz)

0.88, 0.92, 1.07, 1.11

1.22, 1.25 (each 3H, s)

1.63 (1H, d, J = 8.8 Hz)

2.10 (3H, s)

4.27 (1H, dd, J = 9.2, 3.3 Hz)

5.18 (1H, d, J = 2.9 Hz)

5.30 (1H, br.s)

[0031] [Specific Example 7]

50.3 mg of 11- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -boswellic acid-3-O-acetate obtained in Specific Example 6 was taken, dissolved in 6 mL of a 5% potassium hydroxide/methanol and thermally refluxed for 6 hr on a water bath, cooled, and then methanol was removed under reduced

/5

pressure. The residue was dissolved in 20 mL of ether, washed with 2N hydrochloric acid, saturated aqueous sodium bicarbonate and aqueous table salt solution, 15 mL for each, and then dried over anhydrous sodium sulfate. 26.3 mg of a colorless crystal 11- $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -boswellic acid ( $R_1$  and  $R_3$  are hydrogen atoms, and  $R_2$  is  $\alpha$ -hydroxyl in Formula I) having the physicochemical properties shown below was obtained by removing the solvent under reduced pressure and recrystallizing it from hexane/ethanol).

[0032] m.p. 171 - 178°C

$[\alpha]_D = +63.9^\circ$  ( $c = 0.33$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

mass spectrum

EI-MS  $m/z$ : 472 [ $M^+$ ], 454 ( $M^+ - \text{H}_2\text{O}$ )

high-resolution EI-MS  $m/z$ :

calcd. 472.3552  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$

found 472.3556

IR absorption spectrum  $\text{IR}_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :

3690, 3000 - 2500, 1720

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.81 (3H, s), 0.85 (3H, d, J = 5.5 Hz)

0.93 (3H, br.s)

1.07, 1.10, 1.18, 1.37 (each 3H, s)

1.61 (1H, d, J = 8.8 Hz)

4.08 (1H, br.s)

4.26 (1H, dd, J = 9.2, 3.3 Hz)

5.18 (1H, d, J = 2.9 Hz)

[0033] [Reference Example]

25 mL of a 5% potassium hydroxide/methanol was added to 420 mg of  $\alpha$ -boswellic acid acetate obtained in Specific Example 1, refluxed for 8 hr on a water bath, then 25 mL of 2 N hydrochloric acid was added to the reaction solution, and a separated white precipitate was extracted with ether. The ether layer was washed with saturated table salt solution, dried over anhydrous magnesium sulfate, and then the solvent was removed under reduced pressure to obtain a white powder. 312 mg of  $\alpha$ -boswellic acid having the physicochemical properties was obtained as a colorless flaky crystal by recrystallizing it from methanol.

[0032] m.p. 140/190 - 230°C (double m.p.)

$[\alpha]_D = +108.7^\circ$  (c = 0.3, CHCl<sub>3</sub>)

EI-MS m/z:

456 [M<sup>+</sup>], 441, 259, 238, 218, 203

IR absorption spectrum  $\text{IR}_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ :

3400, 2944, 2856, 1720

proton NMR spectrum ( $\delta$  ppm in  $\text{CDCl}_3$ ):

0.84, 0.87, 0.87, 0.89

1.00, 1.15, 1.35 (each 3H, s)

4.08 (1H, t,  $J = 2.6$  Hz)

5.20 (1H, t,  $J = 3.4$  Hz)

[0035] Subsequently, the superior anti-complement activity of compounds of the formula and their usefulness as complement activity inhibitor are illustrated by giving test examples.

[0036] [Test Example 1]

Measurements of the anti-complement activity were carried out by making Meyer's method to a 1/5 scale (Meyer, M. M. *Experimental Immunochemistry*, 2nd, p. 133). Namely, rabbit-anti sheep erythrocyte was used as antibody, sheep erythrocyte was used as antigen and CPD-stored human plasma was used as complement source. The compounds of the formula are sparsely dissolved in water, therefore they were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) so as to become 10 mM and then added into a gelatin-Bernard buffer so that the final concentration became 50  $\mu\text{m}$ . The diluted plasma was changed to 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.5, 0.7 mL, the sensitized sheep erythrocyte was mixed with distilled water and osmosized at 37°C for 2 hr, then the reaction

was stopped by ice cooling, centrifuged for 5 min at 2,500 rpm, and the absorbance of supernatant at 414 nm was measured at the concentrations of diluted plasma. 1  $\mu$ L of DMSO was taken as a control. The results are shown below. CB represents mechanical hemolysis in tables.

[0037] Table 1 (Anti-complement activity of compounds obtained in specific examples)

| Amount of Diluted Plasma (mL) | Control | Compound Obtained in Specific Example 2 | Compound Obtained in Specific Example 3 | Compound Obtained in Specific Example 5 | Compound Obtained in Specific Example 7 | Compound Obtained in Reference Example |
|-------------------------------|---------|---|---|---|---|--|
| 0.25                          | 0.039   | 0.012                                   | 0.007                                   | 0.012                                   | 0.024                                   | 0.077                                  |
| 0.30                          | 0.085   | 0.030                                   | 0.015                                   | 0.048                                   | 0.045                                   | 0.093                                  |
| 0.35                          | 0.128   | 0.049                                   | 0.023                                   | 0.054                                   | 0.080                                   | 0.131                                  |
| 0.40                          | 0.191   | 0.081                                   | 0.033                                   | 0.079                                   | 0.098                                   | 0.168                                  |
| 0.50                          | 0.290   | 0.089                                   | 0.031                                   | 0.154                                   | 0.105                                   | 0.243                                  |
| 0.70                          | 0.532   | 0.272                                   | 0.185                                   | 0.394                                   | 0.447                                   | 0.463                                  |
| CB                            | 0.008   | 0.014                                   | 0.005                                   | 0.010                                   | 0.003                                   | 0.033                                  |

[0038] Table 2 (Concentration dependence of compounds obtained in Specific Example 2)

/6

| Amount of Diluted Plasma (mL) | Control | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|-------------------------------|---------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.23                          | 0.009   | 0.020      | 0.013      | 0.006        | 0.011     |
| 0.30                          | 0.009   | 0.008      | 0.018      | 0.045        | 0.051     |
| 0.35                          | 0.067   | 0.014      | 0.054      | 0.082        | 0.107     |
| 0.40                          | 0.207   | 0.121      | 0.147      | 0.175        | 0.231     |
| 0.50                          | 0.293   | 0.173      | 0.237      | 0.307        | 0.354     |
| 0.70                          | 0.471   | 0.381      | 0.418      | 0.455        | 0.417     |
| CB                            | 0.009   | 0.020      | 0.013      | 0.006        | 0.011     |

[0039] Table 3 (Concentration dependence of compounds obtained in Specific example 3)

| Amount of Diluted Plasma (mL) | Control | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|-------------------------------|---------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.25                          | 0.052   | 0.007      | 0.021      | 0.039        | 0.033     |
| 0.30                          | 0.009   | 0.015      | 0.036      | 0.062        | 0.060     |
| 0.35                          | 0.135   | 0.023      | 0.063      | 0.091        | 0.105     |
| 0.40                          | 0.191   | 0.033      | 0.092      | 0.121        | 0.179     |
| 0.50                          | 0.309   | 0.031      | 0.163      | 0.215        | 0.256     |
| 0.70                          | 0.527   | 0.185      | 0.361      | 0.445        | 0.483     |
| CB                            | 0.004   | 0.005      | 0.008      | 0.005        | 0.011     |

[0040] Table 4 (Concentration dependence of compounds obtained in Specific Example 5)

| Amount of Diluted Plasma (mL) | Control | 50 $\mu$ M | 25 $\mu$ M | 12.5 $\mu$ M | 5 $\mu$ M |
|-------------------------------|---------|------------|------------|--------------|-----------|
| 0.25                          | 0.090   | 0.074      | 0.022      | 0.015        | 0.016     |
| 0.30                          | 0.139   | 0.100      | 0.136      | 0.097        | 0.087     |
| 0.35                          | 0.235   | 0.168      | 0.192      | 0.152        | 0.185     |
| 0.40                          | 0.283   | 0.231      | 0.241      | 0.228        | 0.251     |
| 0.50                          | 0.411   | 0.337      | 0.362      | 0.343        | 0.382     |
| 0.70                          | 0.472   | 0.470      | 0.461      | 0.467        | 0.469     |
| CB                            | 0.012   | 0.017      | 0.022      | 0.015        | 0.016     |

[0041] As is evident from these results, it was proved that the compounds of the formula have the anti-complement activity.

[0042] Next, the doses and preparations of the compounds of the formula are illustrated.

[0043] The compounds of the formula can be administered into animals or mankind as they are or along with conventional carriers for preparations. The forms of administration are not

specially restricted and are used by proper selection according to demand, oral drugs such as tablets, capsules, granules, fine grains, powders, etc. and parenteral drugs such as injections, suppositories, etc. are given.

[0044] To display expected effects as oral drugs, the dose depends on age, body weight of patients and the degree of diseases, usually, 10 - 3 g as weight of the compounds in several doses a day is thought to be suitable for adults.

[0045] The oral drugs are prepared according to ordinary methods with, e. g., starch, lactose, white sugar, mannite, carboxymethyl cellulose, corn starch, inorganic salts, etc.

[0046] In addition to said vehicles, binder, disintegrate, surfactant, lubricant, fluidity improver, corrective, colorant, perfume, etc. can be properly used in these kinds of preparations. Respective specific examples are as shown below.

[0047] [Binders] Starch, dextrin, Arabic gum dust, gelatin, hydroxypropyl starch, methyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, crystalline cellulose, ethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, macrogol.

[0048] [Disintegrants] Starch, hydroxypropyl starch, sodium carboxymethyl cellulose, calcium carboxymethyl cellulose, carboxymethyl cellulose, low-substituted hydroxypropyl cellulose.



[0049] [Surfactants] Sodium lauryl sulfate, soybean lecithin, sucrose fatty acid esters, polysorbate 80.

[0050] [Lubricants] Talc, waxes, hydrogenated vegetable oils, sucrose fatty acid esters, magnesium stearate, calcium stearate, aluminum stearate, polyethylene glycol.

[0051] [Fluidity improvers] Light anhydrous silicic acid, dry aluminum hydroxide gel, synthetic aluminum silicate, magnesium silicate.

[0052] Moreover, the compounds of the formula can also be administered as suspension, emulsion, syrup, elixir, etc., and corrective/flavoring agents, colorants in these various dose forms.

[0053] To display expected effects as parenteral drugs, the does depends on age, body weight of patients and the degree of diseases, usually, intravenous injection, intravenous instillation, subcutaneous injection, muscular injection, etc. of up to 5 - 500 mg as weight of the compounds are thought to be suitable for adults.

[0054] These parenteral drugs are prepared according to ordinary methods, and distilled water for injection, physiological saline, aqueous glucose solution, vegetable oil for injection, sesame oil, peanut oil, soybean oil, corn oil, propylene glycol, polyethylene glycol, etc. can be generally

used as diluents. Bactericide, antiseptic, stabilizer may also be added as necessary. From the viewpoint of stability, these parenteral drugs can also be prepared again from a frozen dry matter into a liquid preparation immediately before use by packing it into a vial, etc. then freezing it, and removing water by common freeze drying technique. Moreover, isotonic agent, stabilizer, antiseptic, indolentia agent, etc. may also be added.

[0055] As other parenteral drugs, external liquid preparations, coating agent such as ointment, etc., suppositories for rectal administration, etc. are given and prepared according to ordinary methods.

[0056] Next, the present invention is illustrated in more /7  
detail by giving actual examples, but the present invention is not limited thereto.

[0057] [Actual Example 1]

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Corn starch                     | 44 g  |
| Crystalline cellulose           | 40 g  |
| Calcium carboxymethyl cellulose | 5 g   |
| Light anhydrous silicic acid    | 0.5 g |
| Magnesium stearate              | 0.5 g |

|   |      |
|---|------|
| Compound obtained in Specific Example 2 | 10 g |
|---|------|

---

|       |       |
|-------|-------|
| Total | 100 g |
|-------|-------|

- were uniformly mixed according to the above formula and compression molded by a tabletting machine to obtain tablets of 200 mg per tablet. 20 mg per tablet of the compound obtained in Specific Example 2 is contained, and 5 - 15 tablets are administered in several doses per day per adult.

[0058] [Actual Example 2]

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Crystalline cellulose | 84.5 g |
|-----------------------|--------|

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Magnesium stearate | 0.5 g |
|--------------------|-------|

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| Calcium carboxymethyl cellulose | 5 g |
|---------------------------------|-----|

|   |      |
|---|------|
| Compound obtained in Specific Example 3 | 10 g |
|---|------|

---

|       |       |
|-------|-------|
| Total | 100 g |
|-------|-------|

, and a part of were uniformly mixed according to the above formula, then and the balance of were added, mixed and compression molded by a tabletting machine to obtain tablets of 200 mg per tablet. 20 mg per tablet of the compound obtained in Specific Example 3 is contained, and 5 - 15 tablets are administered in several doses per day per adult.

[0059] [Actual Example 3]

|  |        |
|--|--------|
| Crystalline cellulose                              | 49.5 g |
| 10% Ethanol solution of hydroxypropyl<br>cellulose | 35 g   |
| Calcium carboxymethyl cellulose                    | 5 g    |
| Magnesium stearate                                 | 0.5 g  |
| Compound obtained in Specific Example 5            | 10 g   |
| <hr/>  |        |
| Total  | 100 g  |

, and were uniformly mixed according to the above formula, kneaded by ordinary method, pelletized by extrusion pelletizer, dried and disintegrated, then and were mixed and the mixture was compression molded by a tabletting machine to obtain tablets of 200 mg per tablet. 20 mg per tablet of the compound obtained in Specific Example 5 is contained, and 5 - 15 tablets are administered in several doses per day per adult.

[0060] [Actual Example 4]

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Corn starch                     | 34.5 g |
| Magnesium stearate              | 50 g   |
| Calcium carboxymethyl cellulose | 5 g    |
| Light anhydrous silicic acid    | 0.5 g  |

|   |       |
|---|-------|
| Compound obtained in Specific Example 7 | 10 g  |
| <hr/>                                   |       |
| Total                                   | 100 g |

- were uniformly mixed according to the above formula, compression molded by a tableting machine, then crushed by a crusher and sieved to obtain granules. 100 mg of the compound obtained in Specific Example 7 is contained in 1 g of this granule, and 1 - 3 g is administered in several doses per day per adult.

[0061] [Actual Example 5]

|  |       |
|--|-------|
| Crystalline cellulose                              | 55 g  |
| 10% Ethanol solution of hydroxypropyl<br>cellulose | 35 g  |
| Compound obtained in Specific Example 2            | 10 g  |
| <hr/>  |       |
| Total  | 100 g |

- were uniformly mixed according to the above formula and then kneaded. The mixture was pelletized by an extrusion pelletizer, dried and sieved to obtain granules. 100 mg of the compound obtained in Specific Example 2 is contained in 1 g of

this granule, and 1 - 3 g is administered in several doses per day per adult.

[0062] [Actual Example 6]

|   |        |
|---|--------|
| Corn starch                             | 89.5 g |
| Light anhydrous silicic acid            | 0.5 g  |
| Compound obtained in Specific Example 3 | 10 g   |
| <hr/>                                   |        |
| Total                                   | 100 g  |

- were uniformly mixed according to the above formula, and 200 mg was packed in a No. 2 capsule. 20 mg of the compound obtained in Specific Example 3 is contained in one capsule of these capsules, and 5 - 15 capsules are administered in several doses per day per adult.

[0063] [Actual Example 7]

|   |        |
|---|--------|
| Soybean oil                             | 5 g    |
| Distilled water for injection           | 89.5 g |
| Soybean phosphatide                     | 2.5 g  |
| Glycerin                                | 2 g    |
| Compound obtained in Specific Example 5 | 1 g    |
| <hr/>                                   |        |
| Total                                   | 100 g  |

was dissolved in and according to the above formula,  
then a solution of and was added and emulsified to obtain an  
injection.